

Action de NaBH₄ sur VII. En solution aqueuse, à pH légèrement alcalin, NaBH₄ est sans action sur la ptérine VII, conformément aux propriétés chimiques d'une ptérine *para*-dihydrogénée.

Réduction catalytique de VII. On hydrogène à 25° 5 mg de ptérine VII dissous dans 5 ml de NaOH 0,05 N, en présence de 10 mg de PtO₂. En 10 min l'hydrogénation est terminée après adsorption d'une mol. d'hydrogène par la ptérine VII. La ptérine tétrahydrogénée VIII ainsi obtenue est incolore et ne présente pas de fluorescence. Son extrême instabilité plaide en faveur de la structure tétrahydrogénée que nous lui avons attribuée. Dès l'ouverture de l'appareil à hydrogénation et même en présence de NaBH₄ la ptérine VIII, au contact de l'air, reprend la fluorescence jaune du produit de départ. Malgré toutes nos précautions et nos essais il nous a été impossible de mesurer ses R_f et son spectre UV.

Réoxydation à l'air de VIII. Les produits de réoxydation, isolés selon les méthodes chromatographiques habituelles, sont les suivants: xanthoptérine, amino-2-dihydroxy-6,8-dihydro-7,10-ptéridine (II) et acide amino-2-hydroxy-6-ptéridine-carbonique-9 (XVI).

RÉSUMÉ

L'ion CN⁻ subit facilement une addition nucléophile sur le carbone 9 de la xanthoptérine et de la dihydro-7,10-xanthoptérine. Le nitrile ainsi formé est très réactif et n'est isolé que comme amide. Après réoxydation à l'air des différents produits d'addition nucléophile on obtient principalement des dérivés de l'acide dihydro-7,10-xanthoptérine-carboxylique-9.

Zurich, Institut de Chimie Organique
de l'Université

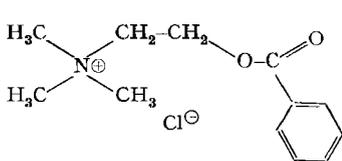
114. Substrat-bedingte Nachbargruppeneffekte als bestimmende Faktoren bei der enzymatischen Hydrolyse

I. Neue Befunde an der Serum-Cholinesterase

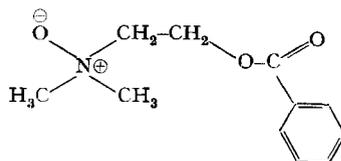
von **Elsbeth Schätzle** und **Max Rottenberg**

(6. III. 62)

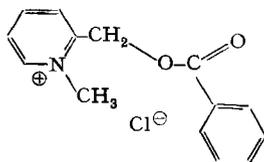
In früheren Arbeiten¹⁾²⁾ waren wir drei Estern (I, II und III) der Benzoesäure begegnet, die sich in ihrer Hydrolyse-Geschwindigkeit bei neutralem und bei alkalischem pH vielseitig und charakteristisch unterscheiden. Es schien deshalb interessant,



I Benzoylcholin-chlorid



II 2-Benzoyloxyäthyl-di-methylaminoxid



III 2-Benzoyloxymethyl-1-methyl-pyridinium-chlorid

¹⁾ E. SCHÄTZLE, M. ROTTENBERG & M. THÜRKAUF, *Helv.* **42**, 1708 (1959).

²⁾ E. SCHÄTZLE, H. URHEIM, M. ROTTENBERG & M. THÜRKAUF, *Experientia* **17**, 350 (1961).

die beiden Ester II und III mit Benzoylcholin (I), einem Standardsubstrat für Serum-Cholinesterase³⁾ bei der Enzym-katalysierten Hydrolyse zu vergleichen.

In Tabelle 1 ist der Aktivierungsgrad f ⁴⁾ zusammen mit den Hydrolyse-Geschwindigkeitskonstanten k_{rel} zusammengestellt; k_{rel} bedeutet die auf Benzoylcholin ($k_{rel} = 1$) bezogene Hydrolyse-Geschwindigkeitskonstante des Esters in jeder Messreihe.

Diskussion der Resultate

Der Aminoxid-Ester II ist in der protonierten Form isoster und iso-elektronisch mit Benzoylcholin und sollte deshalb bei der enzymatischen Hydrolyse das Standard-Substrat gut ersetzen können, falls die *räumliche Gestalt* der entscheidende Faktor wäre; ein weniger gutes Substrat wäre Ester III, der sich mit seinem eingebauten Pyridinring räumlich bedeutend stärker als II vom Cholin unterscheidet. In Wirklichkeit sind aber die Verhältnisse gerade umgekehrt, wie die Messungen (Tabelle 1)

Tabelle 1. Aktivierungsgrad f der Ester I, II und III

Ester	alkalisch			neutral			enzymatisch	
	f	k_{rel}	Ref.	f	k_{rel}	Ref.	k_{rel} ⁶⁾	Ref.
I	500	1	1)	20	1	1)	1	5)
II	250	0,5	5)	2000	100	1)	0,17; 0,26; 0,33	5)
III	1500	3	2)	60	3	5)	1,0; 1,2; 1,1	5)

deutlich zeigen; wir müssen deshalb versuchen, den enzymatischen Vorgang im Sinne neuer Anschauungen zu interpretieren. Würde man bei allen drei Estern eine gleich gute räumliche «Passform» in bezug auf das Enzym voraussetzen, so könnte man sie hinsichtlich ihrer durch die Molekel-Struktur bedingten Hydrolysierbarkeit in drei qualitativ verschiedene Reaktivitäts-Kategorien einteilen:

Ester vom Typus I, mit dominierendem *elektrostatischem Effekt*¹⁾, werden besonders schnell *alkalisch* hydrolysiert.

Ester vom Typus II unterliegen infolge des vorgelagerten Protonengleichgewichtes¹⁾ einer allgemeinen *Säure-Basen-Katalyse* und deshalb einer schnellen Hydrolyse bei *neutralem pH*.

Ester vom Typus III, gekennzeichnet durch einen Spezial-Hydrolysen-Mechanismus²⁾: *Nachbargruppeneffekt* ermöglicht *intramolekulare nucleophile Katalyse*; dies erleichtert Addition von H₂O oder OH⁻ an die Ester-carbonylgruppe; der Ester zeigt *beschleunigte Hydrolyse* im *neutralen* und im *alkalischen* Medium.

Überraschenderweise erweist sich nun gerade dieses Pyridinderivat III als ein dem Cholinester gleichwertiges Substrat für Serum-Cholinesterase. Dieser Befund ist am

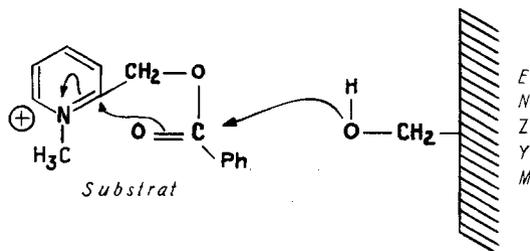
³⁾ W. KALOW, K. GENEST & N. STARON, *Canad. J. Biochemistry Physiol.* 34, 637 (1956).

⁴⁾ Als bequemes, willkürliches Mass für den Aktivierungsgrad (Labilität) eines Esters AB der Benzoesäure mit dem Alkohol A verwenden wir das Verhältnis f der Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Hydrolyse des betr. Esters, bezogen auf diejenige von Äthylbenzoat EtB: $f = k_{AB}/k_{EtB}$.

⁵⁾ Diese Arbeit.

⁶⁾ Die verschiedenen Zahlenwerte entsprechen verschiedenen Enzympräparaten, Enzymkonzentrationen oder Inkubationszeiten.

besten vereinbar mit der Annahme, dass bei der enzymatischen Hydrolyse ein geschwindigkeitsbestimmender Einzelschritt mit *nucleophiler* Katalyse auftritt⁷⁾. Als nucleophiles Zentrum käme vorzugsweise die $-\text{CH}_2\text{OH}$ -Gruppe des den aktiven Bezirk charakterisierenden Serin-Restes⁸⁾ am Enzym in Frage. Die bevorzugten Substrate der Serum-Cholinesterase sind Ester, die von der *Alkohol*-Seite her aktiviert sind; auch aus diesem Grunde⁹⁾ ist der Mechanismus einer nucleophilen Katalyse sehr nahe liegend und ist in der Figur schematisch skizziert.



Nucleophile Katalyse der enzymatischen Hydrolyse von Ester III

Experimenteller Teil¹⁰⁾

1) *Substrate*. – *Benzoylcholinchlorid (I)*: Präparat von HOFFMANN-LA ROCHE. Wurde direkt verwendet.

Benzoyloxyäthyl-dimethylaminoxid (II). Vgl. ¹⁾.

2-Benzoyloxymethyl-N-methyl-pyridiniumchlorid (III). – a) 2-Benzoyloxymethyl-pyridinhydrochlorid. Die Lösung von 22 g Pyridyl-2-carbinol (FLUKA) in 250 ml abs. Toluol wurde unter vermindertem Druck auf ca. 100 ml eingedampft. Unter Kühlung im Eisbad gab man 26 ml Benzoylchlorid zu. Nun wurde abwechselnd geschüttelt und gekühlt, bis keine weitere Erwärmung mehr stattfand. Nach zweitägigem Stehen bei ca. 20° hatte sich 4,8 g Niederschlag gebildet (durch IR.-Spektrum identifiziert als Pyridyl-2-carbinol-hydrochlorid, Smp. 105–107°). Er wurde abfiltriert und mit total 400 ml Methylenchlorid gewaschen. Die vereinigten Toluol-Methylenchlorid-Lösungen wurden bei 40–50° im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde durch Lösen in 75 ml warmem Methylenchlorid und Zusatz von 200 ml Essigester umkristallisiert. Smp. 131–133°; 35 g (70% d. Th.).

b) *2-Benzoyloxymethyl-N-methyl-pyridiniumjodid*. Obiges Hydrochlorid (25 g) wurde durch Behandeln mit KHCO_3 -Lösung und Extrahieren mit Methylenchlorid in die freie Base übergeführt. Diese wurde in 100 ml Benzol und 20 ml Methyljodid bei ca. 20° im Dunkeln aufbewahrt. Nach 7 Tagen wurde der entstandene krist. Niederschlag abfiltriert und mit viel Benzol und zuletzt mit Äther gewaschen. Das getrocknete Präparat vom Smp. 185–186° war analysenrein:

$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{NI}$	Ber.	C 47,33	H 3,97	N 3,96	I 35,73%
(355,25)	Gef. ¹¹⁾	„ 47,18	„ 4,08	„ 4,01	„ 35,51%

c) *Methochlorid II*. Aus dem Jodid durch Schütteln (45 Min.) mit Überschuss an frischgefälltem AgCl in Wasser, Filtrieren und Eindampfen unter vermindertem Druck (Rotations-Verdampfer; Wasserbad von 33°). Der Rückstand wurde aus möglichst wenig heissem Wasser durch Zusatz von viel Aceton umkristallisiert. Gelegentlich enthalten die Präparate Kristall-

⁷⁾ Zur Definition vgl. M. L. BENDER, Chem. Reviews 60, 53 (1960).

⁸⁾ Vgl. K.-B. AUGUSTINSSON, in BOYER-LARDY-MYRBÄCK, The Enzymes, Vol. 4, Part A, S. 536–537 (1960).

⁹⁾ W. P. JENCKS & J. CARRIUOLO, J. Amer. chem. Soc. 83, 1743 (1961).

¹⁰⁾ Die Smp. sind unkorrigiert; Fehlergrenze ca. $\pm 3^\circ$.

¹¹⁾ Mikro-Analysen von HEINRICH E. THOMMEN, Universität Basel.

wasser. Smp. unscharf, Zers. bei ca. 180°. Präparat A, mit ca. 1 H₂O pro Mol; Analyse¹⁴⁾ nach scharfem Trocknen (10 h bei 100° im Ölpumpen-Vak. über P₄O₁₀). Präparat B, lufttrocken analysiert¹²⁾.

C ₁₄ H ₁₄ O ₂ NCl (263,80)	Ber.	C 63,76	H 5,36	N 5,31	Cl 13,44%
	Gef. A	„ 63,25	„ 5,97	„ 5,00	„ 13,26%
	B	„ 63,71	„ 5,50	„ 5,39	„ 13,43%

Für die Messungen wurde das Präparat B verwendet.

2) Die *Geschwindigkeit der alkalischen Hydrolyse* haben wir, ähnlich wie früher ²⁾, durch potentiometrische Titration bei konstantem pH gemessen¹³⁾, jedoch ist die Apparatur inzwischen wesentlich verbessert worden¹⁴⁾. Aus dem Verlauf der Titrationskurven wurde nach dem zweiten (halbgraphischen) Verfahren von GUGGENHEIM¹⁵⁾ die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung k_1 berechnet; die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus vier Messungen mit Fehlergrenze $\pm 5\%$. Bei pH 10,0¹⁶⁾ und 19,6° fanden wir die Werte der Tabelle 2.

Tabelle 2. *Hydrolysegeschwindigkeitskonstanten der Ester I, II und III*

Ester	I	II	III
$k_1 \cdot 10^3$ (min ⁻¹)	1,8	0,88	5,2
C ₀ = 0,025 M (Anfangskonzentration des Esters in bidest. Wasser); Ionenstärke μ = 0,5 M (Zusatz von KCl).			

3. *Ester III, Neutral-Hydrolyse*. Diese Messreihe wurde unter den schon früher für Ester I und Ester II beschriebenen Bedingungen durchgeführt und ergab eine Geschwindigkeits-Konstante erster Ordnung $k_1 = 7,0 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$ min⁻¹ (Temperatur: 100° \pm 0,2°; Anfangs-pH: 4,90; End-pH: 3,08).

4) *Messungen mit Serum-Cholinesterase*. Die Geschwindigkeit der Enzym-katalysierten Ester-Hydrolyse messen wir nach dem Prinzip der Methode von HESTRIN¹⁷⁾: Die Konzentration des noch nicht verbrauchten Substrates wird gemessen, indem man den Ester mit alkalischer Hydroxylamin-Lösung quantitativ umsetzt und die entstandene Hydroxamsäure als Eisen(III)-Komplex kolorimetrisch bestimmt. Wir arbeiten im wesentlichen nach der Modifikation von PILZ¹⁸⁾, die den besonderen Vorteil bietet, dass nach Ausfällung der Serum-Proteine klare und relativ stabile, für die Photometrie geeignete Farblösungen entstehen. PILZ¹⁸⁾ hat das Verfahren ausführlich beschrieben, so dass es hier genügt, folgende Versuchsbedingungen anzugeben: Substrat-Anfangskonzentration C₀ = 0,0016 M; pH: 7,20 (Phosphat-Borat-Puffer 0,1 M); Temperatur: 37° \pm 0,5°.

¹²⁾ Halbmikro-Analyse von Herrn H. WALTER, Laboratorium Wimmis.

¹³⁾ Vgl. C. F. JACOBSEN, J. LÉONIS, K. LINDERSTRÖM-LANG & M. OTTESEN, *Methods of Biochemical Analysis* 4, 171 (1957).

¹⁴⁾ Die Messanordnung ist in unserem Physik-Laboratorium konstruiert und weiterentwickelt worden; wir danken unserem Kollegen H. URHEIM, dipl. Physiker ETH, für seine wertvolle Mitarbeit.

¹⁵⁾ E. A. GUGGENHEIM, *Phil. Mag.* [7] 2, 538 (1926).

¹⁶⁾ In der früheren Arbeit²⁾ haben wir die Kinetik der alkalischen Hydrolyse von Ester I und Ester II bei dem gleichen streng konstant gehaltenen pH verfolgt, das wir als pH 11,0 bestimmt hatten; aus dem Verhältnis der gefundenen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden weitgehende Schlussfolgerungen gezogen. Es hat sich nun gezeigt, dass bei so hohen OH⁻-Konzentrationen, und mit der damals verwendeten Glas-Elektrode die am Instrument abgelesenen *pH-Absolut-Werte* mit einem relativ grossen Alkali-Fehler behaftet sind, so dass sich die *absoluten* Geschwindigkeitskonstanten nicht genau auf das pH 11,0 beziehen. Aus diesem Grunde messen wir jetzt bei einem pH von höchstens 10, unter Verwendung einer verbesserten Glaselektrode. Ein Blick auf die früheren ²⁾ und die jetzigen Messwerte ergibt die beruhigende Feststellung, dass das *Verhältnis* $k_{III}/k_I = k_{III\ rel}$ vollkommen unverändert bleibt.

¹⁷⁾ Vgl. K. B. AUGUSTINSSON, in GLICK, *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 5, 1-63 (1957)

¹⁸⁾ W. PILZ, *Klin. Wochenschr.* 36, 1017 (1958).

Die optische Messung erfolgt in einem automatisch registrierenden Spektralphotometer (PERKIN-ELMER, Spectracord 4000) 30 bis 40 Min. nach Zusatz der FeCl_3 -Lösung bei $540 \text{ m}\mu$ (Absorptions-Maximum der Benzhydroxamsäure). Als Leerwert dient eine Lösung, die alle Reagenzien, aber kein Substrat enthält.

Als Enzympräparate verwendeten wir:

a) *Standard-Human-Serum*, vom SCHWEIZERISCHEN ROTEN KREUZ, wurde direkt verwendet;
 b) Angereichertes Human-Serum (KABI-Serum)¹⁹⁾; *Fraktion IV-6-3* aus Retroplacentarserum, Cholinesterase-Aktivität ca. 100fach angereichert. Für die Inkubationen wurde es mit soviel physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, dass die Enzym-Aktivität pro ml Lösung in der Größenordnung derjenigen des Normalserums lag (13,5 mg Trockenpräparat in 10 ml NaCl -Lösung). Die Reaktion wurde jeweils in Gang gesetzt durch Zusammengeben von 5,00 ml Substrat-Lösung $0,0016 \text{ M}$ und 0,10 ml Standard-Serum bzw. Enzym-Lösung (aus KABI-Serum). Aus den abgelesenen Extinktionswerten berechnen wir die Reaktionsgeschwindigkeiten v , ausgedrückt in $\mu\text{Mol Substrat umgesetzt pro Std. und pro ml Enzym-Lösung bzw. Serum}$. Die einzelnen Messungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3. *Geschwindigkeiten v der enzymatischen Hydrolyse der Ester I-III*

Substrat	Enzym (Serum)	Inkubations- zeit (min)	Extinktion		v pro ml $\mu \text{ Mol/h}$
			Analyse	Blind- versuch*)	
I	Standard	45	0,0835	0,2076	63,7
	KABI	45	0,1024	0,2007	52,2
	KABI	20	0,1612	0,2007	46,5
II	Standard	45	0,1707	0,2147	21,8
	KABI	45	0,1871	0,2147	13,7
	KABI	20	0,2076	0,2147	7,8
III	Standard	45	0,0757	0,2218	70,2
	KABI	45	0,0862	0,2147	64,0
	KABI	20	0,1739	0,2147	45,6

*) Gleicher Ansatz wie «Analyse», aber ohne Enzym.

SUMMARY

Comparative rate studies are presented on the choline-esterasecatalyzed hydrolysis of selected synthetic substrates. Taken in conjunction with previous work on non-enzymatic hydrolysis, the present results provide new evidence that factors other than molecular shape are essential in determining substrate specificities, one important feature being the availability, on the substrate level, of pathways involving anchimeric participation of neighbouring groups during nucleophilic attack on the ester carbonyl. It is suggested that nucleophilic catalysis is a rate determining step in choline-esterasecatalyzed hydrolysis.

KTA Laboratorium Wimmis (Bern)

¹⁹⁾ Dieses kostbare Material wurde uns von der Firma AB KABI, Stockholm, in verdankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.